

组织纤溶酶原激活剂突变体在转基因小鼠乳腺中的表达

周 江 邓继先 刘 红* 程 萱 卢一凡 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 组织纤溶酶原激活剂(tPA)是一种较理想的溶血栓药物,本研究采用其突变体——长效组织纤溶酶原激活剂(LAtPA)的cDNA作为目的基因,将它插入羊 β -乳球蛋白(BLG)基因起始密码之前,使LAtPA的转录、翻译受控于BLG基因的5'、3'序列,再将所构建的BLG-LAtPA用显微注射方法建立转基因鼠,经点杂交筛选和Southern印迹鉴定,获得2只LAtPA基因整合阳性鼠,并在阳性母鼠乳汁中检测到有溶纤活性的LAtPA表达,表达水平1.5 μ g/ml。在这两只转基因鼠的9只F1代子鼠中,有5只是阳性的,tPA表达水平维持在1~2 μ g/ml,BLG-tPA融合基因整合到小鼠基因组,能稳定地遗传给子代。

关键词 组织纤溶酶原激活剂 转基因小鼠 羊 β -乳球蛋白

学科分类号 Q 789

1985年,Lovell-badge^[1]首次提出用转基因动物乳腺生产重组蛋白质,目前利用转基因动物作为生物反应器生产重组蛋白已引起广泛兴趣,转基因动物乳腺生产重组蛋白具有产量高、费用低的特点,并且对表达产物具有翻译后修饰与加工能力。人组织型纤溶酶原激活剂(Human tissue plasminogen activator,tPA)对纤维蛋白有较强的亲和力,可选择性溶解血栓而不引起全身出血倾向,是一种较理想的溶血栓药物^[2]。但由于其在血浆中半衰期短、临床用量大的特点,而且tPA在CHO细胞中的表达水平难以达到中试规模。因此,我们建立乳腺定位表达长效tPA(Longer acting tissue plasminogen activator,LAtPA)突变体转基因小鼠,探索用转基因动物乳腺生产LAtPA的可能性。本项工作采用我所刘士辉、黄培堂等构建的LAtPA cDNA为材料进行了深入研究^[3],LAtPA具有PAI-1活性,在与纤维蛋白亲和力未受损害的同时,特异性提高约46%、半衰期延长1倍,我们利用羊 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin,BLG)基因的两端侧翼序列作为调控元件构建乳腺中表达LAtPA的载体^[4],采用显微注射的方法建立转tPA基因小鼠,为今后大型动物的表达奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒与菌种:宿主菌大肠杆菌RR1、JM103,含BLG的p22质粒,为本室保存。

国家863计划资助项目。

* 中国医学科学院心血管病研究所 北京 100037。

收稿日期:1997-09-10,修回日期:1998-04-16。

含有改构的突变体 tPA cDNA 的质粒 pF103 由本所刘士辉提供。

1.1.2 限制酶及主要化学试剂：限制酶、T4 连接酶等均购于中国华美生物工程公司及 Promega 公司。化学试剂 60% 乳酸钠、透明质酸酶、丙酮酸钠等均购自美国 Sigma 公司；牛血清白蛋白购于华美公司；其它葡萄糖、氯化钙等均为国产分析纯试剂。孕马血清促性腺激素 (PMSG) 购于天津实验动物中心；人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 购自上海生物制药厂；846 麻醉剂购于中国人民解放军农牧大学兽医研究所。M2 及 M16 培养液的配制按文献 [5]。

1.1.3 羊 BLG 基因 5' 端扩增引物由本所合成：

引物 1 5' TGCATGCGCCTGCTGTATAA 3'

引物 2 5' TAGATCTCGAGCTGCAGCTGGGGTCTGTG 3'

1.1.4 实验动物：昆明白小鼠由本院实验动物中心提供。

1.1.5 实验仪器：倒置相差显微镜 (日本尼康)、显微操作仪 (日本岛津)、拉针仪 (日本岛津)、解剖显微镜、二氧化碳培养箱 (NAPCO)、常规手术器械、MiniCycler™ PCR 仪。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取、感受态的制备、DNA 的连接、转化、DNA 片段的回收，依照《分子克隆实验手册》进行 [6]。PCR 扩增的循环条件为：94℃ 变性 30s，61℃ 退火 15s，72℃ 30s。

1.2.2 取卵：供体鼠腹腔注射 0.1ml PMSG，注射时间为 12:00，48h 后注射 0.1ml HCG。注射 HCG 后分别将每只供体母鼠放入种公鼠笼内。超排时间一般为注射 HCG 后 10~13h。将有阴栓的供体母鼠挑出，引颈处死，取出两侧输卵管，置于含 M2 的培养皿中，解剖镜下将输卵管壶腹部撕开，将卵轻轻拨出，加入透明质酸酶 (0.3mg/ml)，用 M2 洗 4 次后，转入 M16 培养液，放入 CO₂ 孵箱中。

1.2.3 受精卵的显微注射：持卵器拉成 80~150μm 直径的细管，烤平断口；用拉针仪拉成针尖约 1μm 直径的注射针。在凹玻片上各滴上 M2 培养液和 DNA 注射液，石蜡油覆盖。低倍镜下将注射针吸入适量的 DNA 注射液，受精卵注入 M2 液滴中。高倍镜下，注射针针尖刺入受精卵雄原核中，将 DNA 液注入约 1 pl，可见雄原核膨胀，迅速抽出注射针，卵注射完毕后，立即将卵转移至 M16 培养液中，CO₂ 孵箱培养 30min。将受精卵从 M16 培养液移置 M2 培养液中，再吸入移卵管中，在解剖镜下找到输卵管伞开口，将移卵管插入伞部后将卵吹入，手术完毕后缝合切口。

1.2.4 鼠尾 DNA 的提取：仔鼠出生 10d，即可用于提取 DNA。按照《分子克隆实验手册》进行。

1.2.5 点杂交筛选转基因鼠：利用设计的扩增 BLG 基因 5' 端引物作为探针， α -³²PdATP 标记，鼠尾 DNA 点膜、杂交按《分子克隆实验手册》操作。

1.2.6 Southern 杂交鉴定转基因阳性鼠：鼠尾 DNA 用 EcoRI 37℃ 酶切过夜，Southern 转印按分子克隆手册操作，洗膜温度 68℃。BLG 5' 端探针用 α -³²PdATP 标记。

1.2.7 阳性鼠乳汁中 tPA 活性测定：采取母鼠乳汁，用双蒸水 10 倍稀释，离心去乳脂，采用纤维蛋白-琼脂糖-平板法测定 tPA 溶纤活性 [7]。

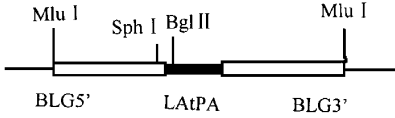


图 1 BLG-LAtPA 融合基因酶切图谱
Fig. 1 Restriction map of BLG-tPA

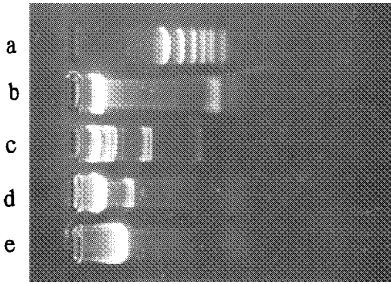


图 2 pBLG-tPA 酶切鉴定图谱

Fig. 2 Identification of pBLG-tPA

- a. Marker (bp): 1543, 994, 695, 515, 377 and 237;
- b. pBLG-tPA digested with Sph I and Bgl II;
- c. λ DNA/Hind III marker; d. pBLG-tPA digested with Mlu I; e. pBLG-tPA

2 结 果

2.1 转基因鼠乳腺表达 LAtPA 载体的构建

羊 β -乳球蛋白 (BLG) 基因, 其 5' 端调控序列长 4kb, 含有 CAP 位点; 3' 端长 4.5kb, 含 Poly A 终止信号。为了在 BLG 基因起始密码 ATG 前插入目的基因, 我们利用合成的一对引物经 PCR 在 BLG 基因 ATG 前引入 Bgl II 酶切位点, 然后将含信号肽序列、长度 2kb 的 LAtPA cDNA 平端插入 Bgl II、Sph I 和 Bgl II 酶切鉴定方向, 能切下 250bp 片段的插入方向正确 (图 1、2), 最后用 Mlu I 将 10.5kb BLG-LAtPA 从载体上切下以去掉原核序列, 回收的 BLG-LAtPA 片段纯化、稀释后作注射用。

2.2 显微注射获得转基因鼠

将上述经过纯化的 BLG-LAtPA 融合基因, 经显微注射导入小鼠受精卵的雄原核中, 再将注射后的受精卵移植入受体假孕母鼠的输卵管伞部, 最后发育成个体, 结果见表 1。

表 1 显微注射结果一览表

Table 1 The results of microinjection

Embryos	Nice embryos	Injected embryos	Transplanted embryops	Mice of receptor	Mice of birth	Positive mice
8000	3000	1106	851	40	31	2

2.3 转基因鼠的点杂交筛选和 Southern 印迹鉴定

正常小鼠基因组 DNA 中没有 BLG 基因及其调控序列, 因此我们用 BLG 基因 5' 端 PCR 扩增的 79bp 片段作为探针, α -³²PdATP 标记, 用斑点杂交对 31 只小鼠的基因组 DNA 进行筛选, 初步获得 3 只阳性鼠。为排除假阳性结果, 接着进行了 Southern 印迹鉴定, 显微注射所用 BLG-LAtPA 融合基因 DNA 序列采用 EcoRI 酶切可以切下含有 BLG5' 端的 5kb 片段, 用 BLG 基因 5' 端 PCR 扩增的 79bp 作为探针, Southern 杂交结果有 2 只鼠出现阳性带 (图 3), 说明这 2 只鼠是 BLG-LAtPA 转基因阳性的。

2.4 阳性鼠表达产物的检测

BLG-LAtPA 转基因小鼠作为一种乳腺生物反应器模型, 其乳腺中应表达目的基因, 未转基因的正常小鼠乳汁中不含 tPA, 将 2 只阳性小鼠合笼 (一雌、一雄), 产仔 11 只, 存活 9 只, 对哺乳期阳性雌鼠麻醉取乳汁 10 μ l, 10 倍稀释, 离心去乳脂, 10 μ l 点样量, 采用纤维蛋白-琼脂糖-平板法测定 tPA 溶纤活性。有活性的 tPA 能激活纤溶酶原成为纤溶酶, 纤溶酶能消化琼脂糖平板上的纤维蛋白, 形成透明圆圈, 通过对比透明圈的大小可测定 tPA 的活性。乳清检测到 tPA 表达水平约为 1.5 μ g/m (图 4), 这也说明乳腺细胞对目的蛋白的加工正确, 生产出具有生物活性的 tPA 产物。

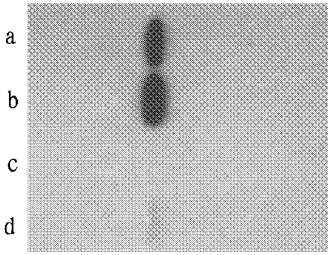


图 3 鼠尾 DNA Southern 印迹鉴定结果

Fig. 3 The result of Southern blot of DNA from tails
a and b. The positive control of pBLG-tPA c. Negative control d. Positive mouse DNA

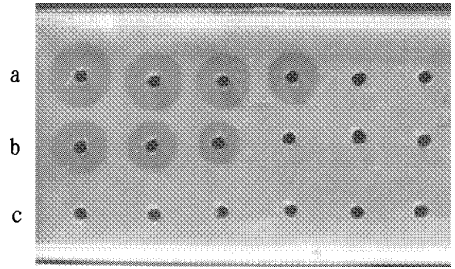


图 4 纤维蛋白-琼脂糖-平板法对 tPA 活性检测

Fig. 4 Clot lysis bioassay of secreted LA_tPA
a. Recombinant tPA standards b. Samples from the positive female mouse c. Negative mouse milk control

2.5 转基因鼠系的建立

在这两只转基因鼠的 F1 代子鼠中, 9 只中有 5 只是阳性的(杂合子), tPA 表达水平维持在 $1\sim 2\mu\text{g}/\text{ml}$ BLG-tPA 融合基因整合到小鼠基因组。经过 3 代杂交筛选, 已获得转基因纯合的小鼠, 转入的 tPA 基因能稳定地遗传给子代。

3 讨 论

1987 年, Gordon 等^[8]首次利用组织纤溶酶原激活剂与小鼠乳清酸蛋白启动子的融合基因, 培育出了 37 只转基因鼠, 外源性 tPA 在小鼠乳腺中得到表达。我们采用的是羊 β -乳球蛋白基因作为调控元件, BLG 是反刍动物乳汁中的一种主要蛋白, 含量高、分泌性强。Clark 等^[9]首先将羊 β -乳球蛋白基因导入小鼠受精卵, 尽管小鼠缺乏 β -乳球蛋白, 在小鼠乳中仍获得比羊乳中高 5 倍的 β -乳球蛋白, 他们在小鼠中表达 α_1 抗胰蛋白酶, 产量高达 $7\text{mg}/\text{ml}$ 。我们所构建的 BLG-LA_tPA 融合基因在小鼠乳腺中的表达, 达到了以下目的: 融合基因整合到小鼠基因组; 目的基因在乳腺细胞中特异性表达; 表达产物随乳汁分泌; 乳腺细胞对表达产物正确翻译加工; 在提高表达效率后, 有可能直接利用泌乳量大的牛、羊制备生物反应器。

为进一步获得高效表达, 我们认为, 获得完整的调控成分, 成为制备乳腺生物反应器的关键。产物分泌由乳汁中分泌信号肽决定, 目前的研究认为无论用乳蛋白基因的信号序列还是目的基因的信号序列都可使目的产物分泌, 这是由真核生物分泌机制的保守性决定的^[10], 但不同的信号序列是否影响分泌速度还不清楚。基于此, 本实验如果采用的 BLG 的信号序列来取代 LA_tPA 的, 应该有助于提高表达量。转基因动物中内含子具有重要作用, 如内含子可能含有增强子或其他顺式调控元件, 内含子能开放染色体的功能域, 从而增进转基因的表达^[11], 因此, 采用 BLG 的基因组 DNA 来调控 LA_tPA 的表达, 以期提高表达效率。目前这两方面的工作正在进行中。

参 考 文 献

- 2 Hotchkiss A, Refino C J, Leonad C K. *Thromb Haemosta*, 1988, **60**:255~261
- 3 刘士辉, 黄培堂, 黄翠芬. *中国科学(B辑)*, 1995, **4**:399~405
- 4 Simons J P, McClenaghan M, Clark A J. *Nature*, 1987, **328**:530~532
- 5 Hogan B, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986
- 6 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 7 Granelli-Piperno A, Reich E J. *J Exp Med*, 1978, **148**:223~234
- 8 Gordon K, Lee E, Vitale J A. *Bio/Technology*, 1987, **5**:1183~1187
- 9 Simons J P, McClenaghan M, Clark A J. *Nature*, 1987, **328**:530~532
- 10 Clark A J, Archibald A L, McClenaghan M. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1993, **339**:225~232
- 11 Ebert K M, Ditulio P, Barry C A. *Bio/Technology*, 1994, **12**:699~702

Production of Longer Acting Human Tissue Plasminogen Activator in Transgenic Mouse Milk

Zhou Jiang Deng Jixian Liu Hong Cheng Xuan Lu Yifan Huang Peitang
(*Institute of Biotechnology, 20 Dongdajie Street, Beijing 100071*)

Abstract An exogenous gene was expressed in the mammary epithelium of transgenic mice in the hope that the encoded protein can be able to secrete into milk. The transgenic mice carrying the promoter and upstream regulatory sequences from the sheep BLG gene which were fused to cDNA encoding human tissue plasminogen activator (tPA) with its endogenous secretion signal sequence were generated. The hybrid genes were microinjected into mouse embryos. Two mouse were identified as being transgene by Southern blot. Milk obtained from lactating females contains biologically active tPA, and concentration was calculated to be about 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. This result establishes the feasibility of secretion into the milk of transgenic animals for production of biologically active tPA proteins, and may provide a powerful method to produce such proteins on a large scale.

Key words Human tissue plasminogen activator, β -lactoglobulin, transgenic mouse